

ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL Y FITOPATOLOGÍA

# EXTRACCIÓN DEL CROMOSOMA COMPLETO DEL FITOPLASMA PRESENTE EN URAPANES (*Fraxinus sp.*), POR ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO

EXTRACTION OF WHOLE CHROMOSOME FROM PHYTOPLASMA OF  
"URAPANES" (*Fraxinus sp.*) BY PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

Paula Andrea Mugno Ramírez, B.Sc.<sup>1,2</sup>

Juan José Filgueira Duarte, Ph.D.<sup>3</sup>



## RESUMEN

Con el fin de purificar el ADN genómico del fitoplasma que afecta a los Urapanes de Bogotá, se realizó introducción de fitoplasmas, utilizando la ectoparásita *Cúscuta subinclusa*, a plantas jóvenes de Urapán, a partir de árboles sintomáticos de fitoplasmosis presentes en la Universidad Militar. La presencia de fitoplasmas fue confirmada en 14 de los 16 Urapanes receptores por medio del test DAPI. Solamente el 12.5% de los Urapanes receptores fue positivo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el par de primers universales para fitoplasmas R16F2n/R16R2. El producto de PCR obtenido a partir de amplificadores de ADN de urapanes receptores con los primers R16F2n/R16R2 fue secuenciado y el análisis de la secuencia mostró similaridad entre el 99% y el 100% con fitoplasmas de distintos tipos. Se realizaron ensayos de Electroforesis de Campo Pulsado (ECP), con los sintomáticos de fitoplasmosis, pero no se obtuvieron bandas a pesar de que se utilizaron grandes cantidades de tejido. Con base en los resultados obtenidos en las pruebas moleculares, se concluyó que las plantas jóvenes de Urapán no son un buen reservorio para el aislamiento de ADN genómico de fitoplasmas. Se realizó introducción de fitoplasmas a plantas de Apio a partir de los Urapanes sintomáticos de la Universidad Militar, para tratar de encontrar un nuevo reservorio para el aislamiento de ADN genómico de fitoplasmas. Las plantas de apio infectadas resultaron positivas por PCR con el par de primers universales para fitoplasmas PhyRNAF3.3/R16R2. En los ensayos de ECP con Apio se obtuvieron bandas de aproximadamente 1125 Kb que se purificaron y se amplificaron por PCR con los primers PhyRNAF3.3/R16R2.

El producto obtenido se mandó a secuenciar y se obtuvo similaridad del 99% con secuencias de tipo "Ash Yellows", incluidas dos secuencias reportadas en 2004 por el grupo de Biotecnología Vegetal de la Universidad Militar.

**Palabras clave:** Urapán, Fitoplasmas "Ash Yellows", Electroforesis de Campo Pulsado, PCR, cromosoma completo

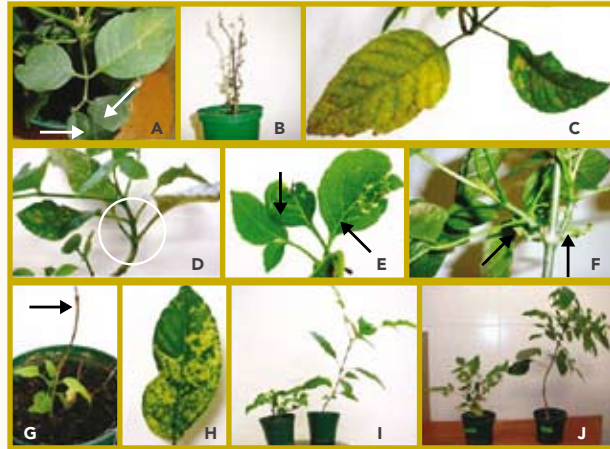
## SUMMARY

In order to purify the genomic ADN of the phytoplasma that infect *Fraxinus* trees of Bogotá, transmission of phytoplasmas to healthy young plants of *Fraxinus* from symptomatic *Fraxinus* trees located in the Universidad Militar Nueva Granada, was made using dodder

The presence of phytoplasmas was confirmed in 14 of the 16 young *Fraxinus* infected plants using DAPI test. Only 12.5% of the young *Fraxinus* plants were positive by Polymerase Chain Reaction (PCR) analyses using the universal phytoplasma primers R16F2n/R16R2. The PCR product obtained from ADN of young Urapan trees was sent for sequencing and the sequence analysis showed homology between 99% and 100% with phytoplasmas of different types. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), assays were made using phytoplasma-infected *Fraxinus* tissue but no bands were obtained despite the large quantities of tissue used. The molecular tests lead to the conclusion that young *Fraxinus* plants, were not optimal reservoirs for the isolation of genomic phytoplasmal ADN. In order to find a new plant host in which high titers of phytoplasmas could be reached, transmission of phytoplasmas to healthy plants of celery from symptomatic Urapan trees, was made using dodder. A 1125

kb fragment, was obtained by PFGE. The fragment was purified and amplified by nested PCR using the universal Phytoplasma primer pair P1/Tint, followed by the phytoplasma primer pair PhyRNAF3.3/R16R2. The PCR product was sequenced and the sequence obtained shared 99% similarity with "Ash Yellows" 16S ADN, including two sequences reported in 2004 by the Plant Biotechnology group at the Universidad Militar Nueva Granada".

**Key words:** Urapan trees, Ash yellows phytoplasmas, pulsed-field gel electrophoresis, PCR, full-length chromosomes



**Figura 1.** Síntomas observados en las plantas jóvenes de Urapán después de la transfección con fitoplasmas. a. Hojas pequeñas, b. Muerte, c. Amarillamiento, d. Acortamiento de entrenudos, e. Hojas deformes, f. Ramificación delicuescente, g. Muerte apical, h. Puntos cloróticos, i y j. Disminución en el crecimiento.

## INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son bacterias Gram-positivas con bajo contenido G+C y están actualmente clasificados en la clase *Mollicutes* (Oshima *et al.*, 2002). Debido a la incapacidad de cultivar fitoplasmas *in vitro*, los caracteres fenotípicos útiles para la identificación y la clasificación han sido difíciles de determinar (Davis y Sinclair, 1998). La caracterización molecular de genes conservados ha proporcionado una solución parcial al problema permitiendo la construcción de un esquema de clasificación independiente de los caracteres fenotípicos. El diagnóstico de una enfermedad basado en los síntomas o por microscopía en circunstancias no adecuadas puede llevar a un diagnóstico erróneo y, por consiguiente, a un mal manejo de la enfermedad. Un diagnóstico preciso, que incluya la identificación del patógeno, es necesario para un control defectivo de la enfermedad (Davis y Sinclair, 1998).

Un carácter significativo de los fitoplasmas es el tamaño de su genoma. La electroforesis de campo pulsado (ECP), es un método capaz de separar físicamente el cromosoma completo del fitoplasma libre de contaminación con el ADN del hospedero (Liefing y Kirkpatrick, 2003). El bajo contenido G+C del ADN cromosómico de los fitoplasmas sugiere que la digestión con endonucleasas de restricción con reconocimiento de secuencias ricas en G+C produciría un número limitado de fragmentos de restricción, que podrían diferir sustancialmente de los fragmentos producidos al digerir el ADN de la planta hospedera, la cual tienen un mayor contenido G+C (Firrao *et al.*, 1996).

Con el establecimiento de la metodología para purificar el cromosoma completo del fitoplasma que afecta a los urapanes de Bogotá, se espera dejar las bases para realizar el mapa físico, así como también contribuir con herramientas moleculares para el diagnóstico de las enfermedades

causadas por estos microorganismos, puesto que plantas y cultivos comerciales también se ven afectados por éstos, y la incapacidad de cultivarlos *in vitro* hace bastante difícil su identificación por otros medios.

## MATERIALES Y METODOS

### Árboles de estudio

Se tomaron siete Urapanes *Fraxinus sp.*, ubicados en la Universidad Militar "Nueva Granada", como árboles donantes de fitoplasmas ya que presentaban síntomas de infección con fitoplasmas.

### Materiales biológicos

Las plantas de Apio, Urapán y *Cúscuta subinclusa* se obtuvieron a partir de semilla.

### Transmisión de fitoplasmas de árboles infectados a árboles de Urapán libres de fitoplasmas

Las plantas sanas se enredaron con brotes exploradores de *Cuscuta subinclusa*. Cuando los haustorios de *C. subinclusa* se podían apreciar

penetrando en el tallo esta planta, esta se trasladó a uno de los árboles de estudio sintomáticos en el cual se enredó un brote explorador de *C. subinclusa*, para llevar a cabo la transfección de los fitoplasmas; el periodo de infección fue de un mes y medio.

### Detección por DAPI de fitoplasmas en los Urapanes receptores

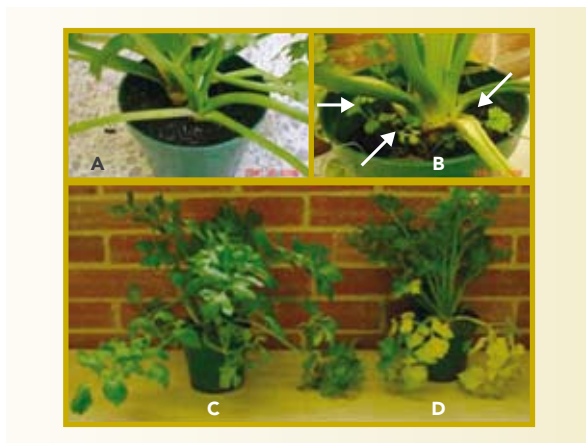
Se realizaron cortes longitudinales, a mano alzada, de la nervadura central de las hojas y se le adicionó una gota de solución DAPI 0.2 µg/ml de DAPI en buffer fosfato de sodio salino (0.9% NaCl, 0.04% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.11% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), y 2.5% glutaraldehído. Las muestras se consideraron positivas para fitoplasmas, si presentaban una fluorescencia azul-blanca en la región del floema.

### Extracción de ADN

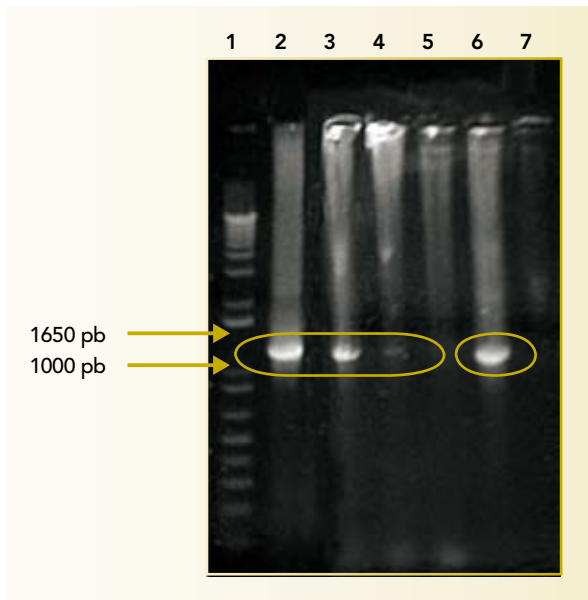
Los Urapanes que resultaron positivos para presencia de fitoplasmas con la prueba DAPI fueron sometidos a extracción del ADN, la cual se hizo por medio del método químico de extracción estándar que emplea CTAB (N.I Harrison, comunicación personal, Universidad de Florida).

### Ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizaron dos pares de primers, R16mR1/R16mF2 y P1/Tint para las PCR primarias y dos pares de primers, R16F2n/R16R2 y PhyRNAF3.3/R16R2 para las PCR anidadas. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: denaturación inicial 5 minutos a 95°C, denaturación por 1 minuto a 95°C, apareamiento a 55°C (primaria) y a 54°C (anidada) por 1 minuto, extensión por 2min a 72°C, y extensión final 10 min a 72°C, por 35 ciclos. Como control negativo se utilizó ADN de



**Figura 2.** Síntomas en las plantas de apio después de la transfección con fitoplasmas. a. Apio no transfectado, b. Apio transfectado con rebrotamiento en la base, c. Apio no transfectado, d. Apio transfectado con amarillamiento.



**Figura 3.** PCR anidada con los primers R16F2N/R16R2. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Control positivo; carril 3: Receptor 1; carril 4: Receptor 8; carril 5: Receptor 4; carril 6: Receptor 1; carril 7: Control agua.

Urapán no expuesto a infección con fitoplasmas, como control positivo ADN del Clon 5 (falta mencionar que plásmido es *Escherichia coli* cepa JM109 que contiene un plásmido con un inserto de 1700 pb del gen *16S rADN* de la cepa AshY1 de Norteamérica).

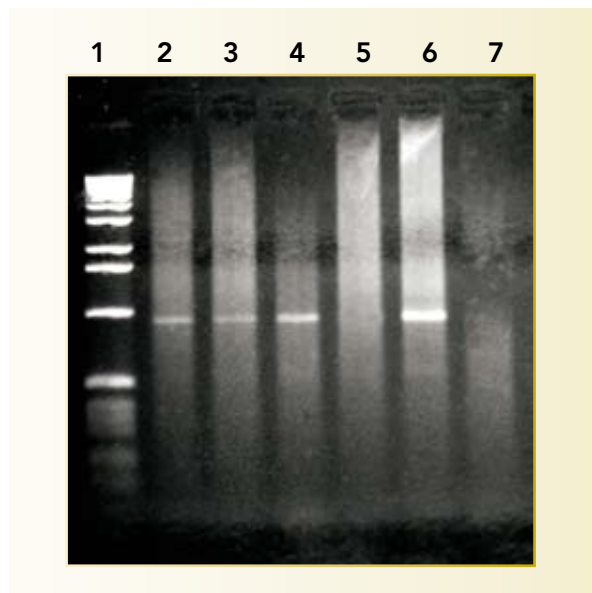
### Secuenciación de ADN

Los productos de PCR (20  $\mu$ l) obtenidos se purificaron utilizando el kit Concert™ de Gibco® para purificación de productos de PCR, según instrucciones del fabricante se enviaron Macro-gen Inc., Korea, para secuenciación.

### Extracción del cromosoma completo del fitoplasma que infecta al Urapán por electroforesis de campo pulsado (ECP)

Se utilizó el protocolo de extracción descrito por Padovan y colaboradores (2000), con algunas

modificaciones. Se tomaron entre 2g y 10g de tejido de la nervadura central de hojas de Urapán, *C. roseus* (Vinca), y Apio para la extracción. Los extractos de ADN fueron digeridos con enzimas de restricción para linearizar los cromosomas. Se utilizó el protocolo de Firrao y colaboradores (1996). Se procedió a correr la ECP en el sistema de electroforesis de campo pulsado CHEF-DR®II de Biorad®, bajo las siguientes condiciones: gel de agarosa Pulse Field Certified Agarose (Biorad®), al 1%, a 6V/cm durante 20 horas con pulsos de 2s-40s en buffer TBE 0.5X mantenido a 14°C. El gel se tiñó posterior a la electroforesis con bromuro de etidio a una concentración final, de 0.5 mg/ml durante una hora seguido de varios lavados con agua destilada de media hora cada uno. El peso molecular de las bandas de obtenidas por ECP se estimó comparando la migración con cromosomas de *S. cerevisiae* (Biorad®).



**Figura 4.** PCR anidada con los primers PhyrRNAF3.3/R16R2. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Apio 2; carril 3: Apio 4; carril 4: Apio 5; carril 5: Apio no expuesto; carril 6: Control positivo carril 7: Control agua.

### Purificación de ADN de las bandas obtenidas por Electroforesis de Campo Pulsado

Para la purificación del ADN se utilizó el protocolo de digestión con  $\beta$ -agarasa de la casa comercial Sigma.

## RESULTADOS

### Evaluación de síntomas de las plantas de apio y Urapán después de haber sido retiradas de los árboles sintomáticos

En la figura 1 y 2 se muestran los síntomas observados en las plantas jóvenes de apio y Urapán luego del periodo de transfección de fitoplasmas.

#### Test DAPI

Se encontró presencia de fitoplasmas en el floema en catorce de los dieciséis receptores analizados por DAPI. En los receptores 4 y 18, aunque hubo presencia de síntomas no se detectaron fitoplasmas.

#### Ensayos de PCR

En dos de los 16 Urapanes jóvenes infectados con *C. subinlusa* se obtuvieron amplificaciones del tamaño esperado (1412 pb; figura 3), mediante PCR anidada con los primers R16F2n/R16R2 (PCR primaria con los primers R16mF2/R16mR1), lo que corresponde al 12.5% de las muestras.

Se obtuvo amplificación positiva, del tamaño esperado (941 pb), en la PCR anidada con los primers universales para fitoplasmas PhyrRNAF3.3/R16R2, en los tres apios transfectados (figura 4).

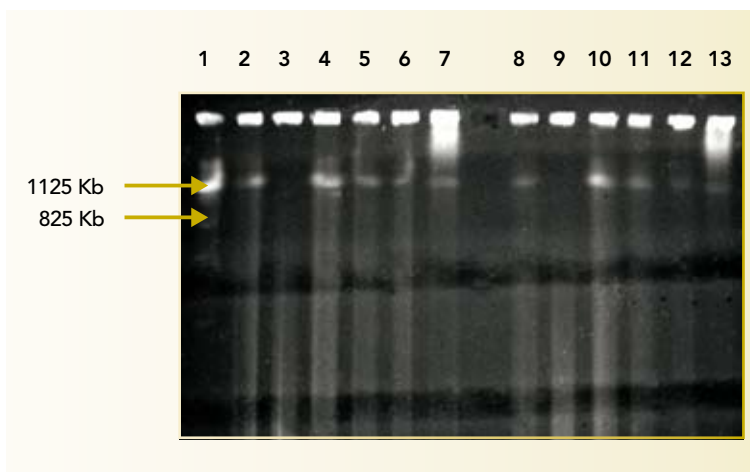


Figura 5. Electroforesis de campo pulsado de apio, vinca y clon 5 digeridos con *Sma* I. Carril 1: Marcador 5.0 Kb; carriles 2 y 8: Apio 2; carriles 3 y 9: Apio no expuesto; carriles 4 y 10: Apio 5; carriles 5 y 11: Apio 4; carriles 6 y 12: Vinca 54; carriles 7 y 13: Clon 5.

### Ensayos de Electroforesis de Campo Pulsado

Con los Urapanes no se logró obtener bandas en ninguno de los ensayos de campo pulsado realizados, a pesar de que mostraron síntomas asociados a fitoplasmosis y presentaron una buena concentración de fitoplasmas en el floema al ser observados con tinción DAPI. La figura 5 muestra el bandeo obtenido a partir de las plantas de apio transfectadas con fitoplasmas. No se produjeron bandas en el apio no expuesto. En las demás muestras, se obtuvo una banda de aproximadamente 1125 Kb que está dentro del rango de tamaño de genomas de fitoplasmas que va de 530 Kb a 1350 Kb (Marcone *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2005).

Para comprobar que el ADN obtenido en las bandas de campo pulsado pertenecía a fitoplasmas, se cortaron las bandas del gel y se purificó el ADN con el protocolo de  $\beta$ -agarasa, al ADN obtenido se le realizó PCR. Se obtuvo amplificación positiva, del tamaño esperado



**Figura 6.** PCR anidada del ADN recuperado de las bandas del gel de campo pulsado. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Apio 2; carriles 3-5: Apio 5; carril 6: Apio no expuesto; carril 7: control positivo; carril 8: Control agua.

(941 pb), en la PCR anidada con los primers universales para fitoplasmas PhyrRNAF3.3/R16R2 (figura 6).

### Secuenciación

Los productos PCR del ADN purificado de las bandas de electroforesis de campo pulsado, fueron enviados para secuenciación. La secuencia obtenida con el primer PhyrRNAF3.3 fue sometida a un BLAST, con la base de datos de NCBI, con el fin de buscar homología entre esta secuencia y secuencias de fitoplasmas reportadas.

La tabla 1 muestra la homología encontrada entre la secuencia obtenida con el producto de PCR del ADN de apio, purificado del gel de campo pulsado, y secuencias de fitoplasmas reportadas en NCBI.

La secuencia mostró homología del 98% y 99% con secuencias reportadas del tipo "Ash Yellows", entre estas secuencias se encuentran dos secuencias de aislados de fitoplasmas del grupo VII-A colombianos, '*Candidatus Phytoplasma fraxini*' aislado AYColY3 y '*Candidatus Phytoplasma fraxini*' aislado AYCol5, reportadas por el grupo de Biotecnología Vegetal de la Universidad Militar "Nueva Granada" en 2004.

Con los resultados obtenidos en el BLAST, se puede decir que el ADN de la banda de 1125 Kb obtenida en la electroforesis de campo pulsado a partir de tejido de apio transfecado con fitoplasmas desde los Urapanes sintomáticos de estudio de la Universidad Militar, es de fitoplasmas de tipo "Ash Yellows".

### DISCUSIÓN

La infección con fitoplasmas a plantas jóvenes de Urapán receptoras fue más rápida que en las plantas de *C. roseus* receptoras transfecadas por López en 2005. En las plantas jóvenes de Urapán, los síntomas de fitoplasmosis (disminución en el crecimiento, acortamiento de entrenudos, hojas pequeñas y proliferación de brotes), empezaron a manifestarse en menos de treinta días desde el inicio de la infección. La inoculación de estas plantas fue apoyada por el test DAPI, en el que se observó presencia de fitoplasmas en el floema de catorce de las dieciséis plantas receptoras evaluadas. López (2005), reportó síntomas en las plantas receptoras de *C. roseus* ochenta días después de la transfección de fitoplasmas desde los Urapanes sintomáticos de estudio. A pesar de la rápida aparición de síntomas en las plantas de Urapán receptoras y la detección de fitoplasmas por

medio del test DAPI, los ensayos de PCR solamente dieron resultados positivos en el 12.5% de los Urapanes receptores. Estos resultados son similares a los reportados por Gaitán (2004), y Gutierrez (2006), quienes también obtuvieron un bajo porcentaje de plantas de Urapán positivas por PCR a pesar de que la mayoría mostraba síntomas relacionados con fitoplasmosis. La presencia de compuestos inhibidores, como fenoles o carbohidratos, la baja concentración y la distribución irregular de los fitoplasmas en el floema de los diferentes órganos de las plantas jóvenes de Urapán sintomáticas.

El análisis de la secuencia obtenida a partir del producto de PCR anidada obtenido con

Nuestros datos indican que, las plantas jóvenes de Urapán no son buenos reservorios de fitoplasmas para ensayos de electroforesis de campo pulsado por que no observaban bandas en los geles de campo pulsado, ni siquiera cuando los bloques de agarosa fueron preparados a partir de tejido de floema previamente disectado de la nervadura central de las hojas de Urapán.

Para Firrao y colaboradores (1996), la habilidad de identificar fácilmente los fragmentos de restricción en el gel de campo pulsado teñido con bromuro de etidio, era debida al hecho de que el fitoplasma causante de la enfermedad "Western X" presentaba mayores

La secuencia obtenida a partir del producto de PCR anidada con los primers PhyrRNAF3.3/R16R2 mostró homología del 99 % con secuencias de fitoplasmas de tipo "Ash Yellows" con lo que se puede concluir que la banda obtenida en el gel de campo pulsado contiene ADN de fitoplasmas de tipo "Ash Yellows".

los primers R16F2N/R16R2, reveló que los Urapanes receptores estaban infectados con fitoplasmas, confirmando de esta manera una infección exitosa. El resultado del BLAST, arrojó homologías de 100% y del 99% con secuencias de fitoplasmas de varios tipos, por lo tanto, no fue posible identificar qué fitoplasma era el que estaba infectando a las plantas jóvenes de Urapán.

concentraciones en plantas de Apio. Preparaciones similares a partir de otros hospederos, como Vinca, generalmente no alcanzaban altas concentraciones, y los fragmentos de fitoplasmas en el gel de campo pulsado necesitaban ser identificados por medio de hibridación por Southern Blot.

Por las razones mencionadas anteriormente, y reportes de otros autores como Marcone



GenBank Homology	Accession Number in GenBank	Marker (Bits)	E Value	Size of the compared fragment (pb)	Identity
"Ash Yellows" phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer region, and tRNA-Ile gene, complete sequence.	<a href="#">AF092209</a>	1612	0.0	820	818 (99%)
Candidatus Phytoplasma fraxini 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<a href="#">DQ194355.2</a>	1588	0.0	820	815 (99%)
Candidatus Phytoplasma fraxini strain AYCol3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<a href="#">AY661425.1</a>	1564	0.0	808	804 (99%)
Candidatus Phytoplasma fraxini strain AYCol5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	<a href="#">AY661423.1</a>	1548	0.0	785	784 (99%)

Tabla 1. Homología encontrada entre la secuencia de ADN obtenida del apio por PCR anidada y secuencias de fitoplasmas reportadas en NCBI.

y colaboradores (1999), se procedió a utilizar plantas de Apio como reservorios de fitoplasmas para los ensayos de electroforesis de campo pulsado.

Los ensayos de transfección de fitoplasmas a plantas de Apio resultaron exitosos y se realizaron en un tiempo relativamente corto (un mes y medio). Todas las plantas de Apio transfectadas resultaron positivas por PCR, confirmando de esta manera la capacidad del Apio para concentrar buenos títulos de fitoplasmas.

En los ensayos de electroforesis de campo pulsado con las plantas de Apio, se pudieron obtener bandas de buena resolución utilizando solamente 2 gramos de tejido, se puede afirmar por lo tanto, que el Apio es mejor reservorio de fitoplasmas que las plantas de *C. roseus* porque para obtener bandas en el gel de campo pulsado que tuvieran la misma resolución que las bandas del Apio, se necesitaron al menos 5 gramos de tejido de *C. roseus* (resultados no publicados).

La banda obtenida en los ensayos de campo pulsado tanto en Apio como en Vinca fue de 1125 Kb, este tamaño está dentro del rango del tamaño de los cromosomas de fitoplasmas aislados hasta el momento, que va de 530 Kb a 1350 Kb (Marcone *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2005).

En los ensayos de PCR con el ADN purificado del gel de campo pulsado se obtuvieron amplificados del tamaño esperado (941 pb), con el par de primers universales para fitoplasmas PhyrRNAF3.3/R16R2, confirmando de esta manera la presencia de ADN de fitoplasmas en la banda de 1125 Kb obtenida en la electroforesis de campo pulsado.

La secuencia obtenida a partir del producto de PCR anidada con los primers PhyrRNAF3.3/R16R2 mostró homología del 99 % con secuencias de fitoplasmas de tipo "Ash Yellows" con lo que se puede concluir que la banda obtenida en el gel de campo pulsado contiene ADN de fitoplasmas de tipo "Ash Yellows".

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Christensen N, Axelsen K, Nicolaisen M, Schulz A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*. 10: 526-534.
- 2- Davis RE, Sinclair WA. 1998. Phytoplasma Identity and Disease Etiology. *Phytopathology* 88:1372-1375.
- 3- Firrao G, Smart C, Kirkpatrick B. 1996. Physical map of the western X-disease phytoplasma chromosome. *Journal of Bacteriology*. 178: 3985-3988.
- 4- Gaitán S. 2003. Detección y caracterización molecular de fitoplasmas tipo "Ash Yellows" en Urapanes de Bogotá. Tesis de maestría. Postgrado Interfacultades en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Microbiología. Universidad Nacional de Colombia.
- 5- Gutierrez C. 2006. Variabilidad molecular de fitoplasmas asociados a *Fraxinus* sp. en Colombia. Tesis de maestría. Postgrado Interfacultades en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia.
- 6- Liefting L, Kirkpatrick B. 2003. Cosmid Cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*. 221: 203-211.
- 7- López K. 2005. Infección y concentración de fitoplasmas tipo AshY en *Catharanthus roseus* a partir de árboles de *Fraxinus* sp. infectados. Tesis de pregrado. Universidad Militar "Nueva Granada". Facultad de ciencias.
- 8- Marcone C, Neimark H, Ragozzino A, Lauer U, Seemüller E. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*. 89: 805-810.
- 9- Marcone C, Ragazzino A, Camele I, Rana G, Seemüller E. 2001. Updating and extending genetic characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*. 83: 133-138.
- 10- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung H, Wei W, Susuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S. 2003. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature on line*. pp. 1-3.
- 11- Padovan A, Firrao G, Schneider B, Gibb K. 2000. Chromosome mapping of the sweet potato little leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. *Microbiology*. 146: 893-902.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Militar "Nueva Granada" por proporcionar los recursos físicos y económicos para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.